

B24

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
 INSTITUT NATIONAL
 DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
 PARIS

(11) N° de publication : **2 727 129**

(à n'utiliser que pour les
 commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **94 14187**

(51) Int Cl⁶ : C 12 N 1/16, 1/14, 15/52, C 12 Q 1/02

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 21.11.94.

(71) Demandeur(s) : RHONE POULENC AGROCHIMIE —
 FR.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
 demande : 24.05.96 Bulletin 96/21.

(72) Inventeur(s) : LEBRUN MICHEL, GROSJEAN
 COURNOYER MARIE CLAIRE et HOLLOWON
 DEREK W.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de
 recherche préliminaire : Se reporter à la fin du
 présent fascicule.

(73) Titulaire(s) :

(60) Références à d'autres documents nationaux
 apparentés :

(74) Mandataire :

(54) **SYSTEME DE CRIBLAGE PERMETTANT DE SELECTIONNER DES MOLECULES AYANT UNE ACTIVITE
 SPECIFIQUEMENT DIRIGEE CONTRE UNE CIBLE BIOCHIMIQUE DETERMINEE.**

(57) 1. Système de criblage permettant de sélectionner des
 molécules ayant une activité spécifiquement dirigée contre
 une cible biochimique déterminée.

2. Il comprend au moins deux microorganismes distincts,
 identiques du point de vue génétique à l'exception de l'acti-
 vité cible ou d'un homologue de cette activité:

le premier pour tester l'expression de l'activité cible ca-
 pable de compléter un microorganisme ne présentant
 plus d'activité homologue endogène et permettre ainsi sa
 croissance,

le second pour tester l'expression d'une activité homo-
 logue à l'activité cible provenant d'un organisme quelcon-
 que et capable de compléter le même microorganisme
 ne présentant plus d'activité homologue endogène et per-
 mettre ainsi sa croissance.

FR 2 727 129 - A1



1

Système de criblage permettant de sélectionner des molécules ayant une activité spécifiquement dirigée contre une cible biochimique déterminée

5 La présente invention a pour objet un système de criblage permettant de sélectionner des molécules ayant une activité spécifiquement dirigée contre une cible biochimique déterminée.

10 La nécessité d'obtenir des produits phytosanitaires à mode d'action parfaitement caractérisé rend de plus en plus indispensable l'utilisation de tests de criblages permettant de sélectionner les molécules issues de la synthèse sur la base d'un critère d'activité spécifique vis à vis d'une cible biochimique déterminée. De tels tests doivent de plus être adaptable à un criblage d'un très grand nombre de produits. Une des conditions serait d'automatiser l'utilisation de tels tests et par conséquent les paramètres mesurables du test doivent être simples à observer.

15 L'oïdium des céréales (*Erysiphe graminis*), des arbres fruitiers et de la vigne représente une maladie causant la destruction d'une part appréciable des récoltes. Cette maladie est contrôlée par différents produits à activité fongicide et, en particulier, de la famille des triazoles. La nécessité de produits alternatifs est évidente. Cependant, les moyens de criblage sur oïdium sont compliqués par la nature de parasite obligatoire de ce 20 champignon. En effet, sa croissance est impossible en dehors de la présence de la plante hôte, ce qui exclue toute possibilité de test de criblage sur boîtes de Pétri et nécessite un criblage en sérre relativement lourd à mettre en oeuvre.

25 La présente invention a pour but de répondre à ce besoin en proposant un système de criblage spécifique *in vitro* et adaptable au criblage d'un très grand nombre de produits. Elle concerne plus particulièrement un système de criblage permettant de sélectionner des molécules ayant une activité spécifiquement dirigée contre une cible biochimique déterminée, comprenant au moins deux microorganismes distincts, identiques du point de vue 30 génétique à l'exception de l'activité cible ou d'un homologue de cette activité:

- le premier pour tester l'expression de l'activité cible capable de complémenter un microorganisme ne présentant plus d'activité homologue endogène et permettre ainsi sa croissance,
- le second pour tester l'expression d'une activité homologue à l'activité cible provenant d'un organisme quelconque et capable de complémenter le même microorganisme ne présentant plus d'activité homologue endogène et permettre ainsi sa croissance.

35 De préférence le système comprend 2 ou 3 microorganismes distincts.

Ces microorganismes peuvent être soit eukaryotes, soit prokaryotes.

Les microorganismes complémentés sont nouveaux et font également partie de l'invention. Ils sont caractérisés n ce qu'ils ne présentent plus, par mutation, d'activité

homologue de l'activité d'une cible déterminée et qu'il sont complémentés par expression de l'activité cible ou d'une activité homologue.

Les microorganismes sont rigoureusement identiques d'un point de vue génétique à l'exception de l'expression de l'activité cible ou d'un homologue de cette activité. L'inhibition différentielle potentielle de leur croissance ne peut résulter que de l'inhibition de l'activité qui les différencie. Une inhibition de la croissance des deux résulterait, soit de l'inhibition d'une activité commune, soit de l'inhibition par un même produit de l'activité qui les différencie. Par conséquent, l'observation de la croissance de ces deux types de microorganismes permet 10 de cibler des molécules ayant une activité inhibitrice spécifique de la cible biochimique donnée.

Toute cible biochimique peut être utilisée afin de réaliser le système de criblage qui fait l'objet de la présente invention, qu'elle soit d'origine végétale, fongique, bactérienne, animale ou humaine. Cependant, afin de permettre une observation simple basée sur le critère 15 de croissance, il est préféré que l'inhibition de l'activité de la cible biochimique soit létale pour la croissance du microorganisme, au moins dans un milieu de culture déterminé.

Par activité cible, on entend l'activité enzymatique présente dans l'organisme dont on veut assurer le contrôle par la découverte de produits.

Par activité homologue à l'activité cible, on entend l'activité enzymatique identique à celle contenue dans l'organisme cible, mais présente dans un autre organisme.

Par complémentation, on entend la capacité d'une activité enzymatique hétérologue, c'est à dire provenant d'une source différente de celle de l'organisme hôte utilisé pour l'exprimer, à permettre la restauration d'un comportement analogue ou très proche du comportement de l'organisme sauvage, c'est à dire non modifié, à un organisme hôte modifié, 25 dont le comportement, par rapport à un type sauvage, est altéré par absence de cette activité.

L'acétylcoenzyme A carboxylase (ACoACase ou ACCase; EC 6.4.1.2) catalyse la carboxylation ATP-dépendante de l'acétyl-CoA pour produire du malonyl-CoA. Le malonyl-CoA produit par l'ACoACase est utilisé dans diverses réactions et voies métaboliques: en particulier elle représente l'étape limitante de la voie de biosynthèse des acides gras. Chez les 30 organismes de type eukaryote, les trois activités composant l'activité ACoACase (biotin-carboxyl carrier protein, biotin carboxylase et carboxyltransferase) sont portées par un seul polypeptide multifonctionnel. La séquence codant pour les gènes ou ADNc de plusieurs ACoACase est connue et a été publiée. La taille de l'ADNc complet est de l'ordre de 7 kbp pour la partie codante. Cependant, à l'exception du gène codant pour l'ACoACase de levure (acc1), aucune des séquences publiées ne correspond à un équivalent complet d'un ADNc codant pour l'ACoACase. C'est à dire que la séquence a été obtenue à partir de clones d'ADNc incomplets et chevauchant, mais la reconstruction ou l'obtention d'un ADNc complet et fonctionnel, car permettant la synthèse d'un polypeptide actif, n'a jamais été rapportée. Il a 35

5 été montré que l'inactivation par disruption génique du gène codant pour l'ACoACase de la levure *Saccharomyces cerevisiae* était létale à l'état haploïde. Il est de plus bien connu que certaines isoformes de l'enzyme de plantes monocotylédones sont inhibées par des produits herbicides de la famille des aryloxyphenoxypropionates et des cyclohexanediones et que cette inhibition conduit à la destruction des plantes sensibles, confirmant ainsi le caractère létal de l'inactivation de l'ACoACase sensible à ces produits. L'invention a également pour objet la séquence du gène codant pour l'ACoACase d'*Erysiphe graminis*, qui est nouvelle.

10 L'invention a également pour objet un procédé pour cribler des molécules protectrices des plantes qui consiste à préparer les microorganismes tels que décrits ci-dessus. La mise en œuvre du système de criblage tel que décrit dans la présente invention pour la sélection de molécules présentant une activité spécifique d'inhibition vis à vis d'une cible biochimique déterminée, et particulièrement de l'ACoACase d'oïdium, est réalisée de la façon suivante. Un ou l'autre des microorganismes mutants, *Neurospora* ou levure, décrits dans les 15 exemples développés ci-dessous, est complémenté avec les ACoACases provenant de différentes sources: rat, oïdium par exemple. On obtient donc un microorganisme exprimant un type d'ACoACase et l'autre microorganisme exprimant l'autre type d'ACoACase. Ces deux microorganismes sont strictement identiques par ailleurs. Les deux microorganismes sont mis en présence du produit à tester et on observe l'inhibition éventuelle de la croissance, par 20 exemple en culture dans un dispositif de microplaques. Si une inhibition de la croissance du microorganisme exprimant l'activité ACoACase d'oïdium est observée en même temps qu'une absence d'inhibition de croissance du microorganisme exprimant l'activité ACoACase, par exemple de rat, on peut alors conclure que ce produit a une action spécifique sur l'ACoACase d'oïdium. Une observation de ce type correspond bien au résultat attendu de la mise en œuvre du système de criblage tel que décrit dans la présente invention.

25

Deux exemples sont présentés afin de donner un aperçu du champ d'application de la présente invention. Ces exemples ne sont pas restrictifs et n'épuisent évidemment pas toutes les possibilités d'utilisation d'un tel système de criblage par un homme de métier.

30 Seules les techniques non généralement accessibles ou peu répandues en utilisation de routine, comme par exemple la transformation de *Neurospora crassa* ou les techniques de mutagénèses spécifiques à ce champignon, ont été décrites de façon exhaustive. En ce qui concerne les techniques d'extraction, de manipulations enzymatiques, d'observation visuelle ou après marquage radioactif des acides nucléiques, elles sont décrites dans la plupart des 35 manuels de référence. Les modifications enregistrées entre les différentes versions n'ont pas de conséquences qualitatives sur le résultat attendu. De même en ce qui concerne l'utilisation de la levure *Saccharomyces cerevisiae* et, en particulier, les techniques de recombinaison homologue de l'ADN pour l'obtention de mutants. L'homme de l'art peut donc avec bénéfice

ch isir une ou un mélange de ces différentes méthodes. Les deux manuels de référence que nous avons utilisés pour les expériences décrites ci-dessous sont tout à fait généralement accessibles:

5 o Current Protocols in Molecular Biology, 2 volumes (1994) Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl K. editors, John Wiley and Sons, Inc. Ce manuel de référence sera cité par la suite comme "CPMB".

o Molecular cloning: a laboratory manual, 3 volumes (1989) Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. editors, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Ce manuel de référence sera cité par la suite comme "Maniatis".

10

Exemple 1

15 Dans ce premier exemple, une souche de levure diploïde disruptée dans une des copies du gène *acc1*, c'est à dire dont le gène *acc1* a été spécifiquement inactivé, a été complémentée par l'expression d'un ADNc d'ACoACase de rat. La sporulation des levures transformées a permis d'obtenir des levures haploïdes disruptées gardant leur capacité de croissance par expression de l'activité ACoACase de rat.

1) Obtention d'une souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* diploïde présentant une copie disruptée du gène *acc1*

20 La souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* YPH 501 utilisée pour ce travail a été obtenue auprès du fournisseur Stratagene, n° catalogue: 2174415. Cette souche présente le génotype suivant: *mat a/a, ura3-52, lys2-801amber, ade2-101ochre, trp1-D63, his3-D200, leu2-D1*.

a- obtention du fragment disruptant

25 L'ADN de la souche YPH 501 a été extrait suivant le protocole décrit dans le "CPMB". Cent ng d'ADN génomique ont été utilisés pour amplifier un fragment de l'ACoACase de levure dont la séquence est décrite dans: Al-Feel W., Chirala S.S. and Wakil S.J. (1992) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 89, 4534-4538. Cent cinquante ng de chacun des deux oligonucléotides suivants ont été utilisés sous un volume final de 50 ml, la position nucléotidique correspondant à la première base 5' par rapport à la séquence publiée est indiquée entre parenthèse à côté de l'extrémité 5':

30 oligo1: 5'(4800)-GACGAATTCTCAATAAGG-3' (site EcoRI souligné)

oligo2: 5'(6188)-GATAATTGAGATCTCAATTC-3' (site BglII souligné)

35 Les conditions de la PCR sont celles décrites par le fournisseur Perkin-Elmer avec un appareil de type 9600. Les conditions de cycles utilisées sont: 5min./95°C-35x(30sec./95°C-30sec./50°C-1min.30sec./72°C)-5min./72°C. La taille du fragment amplifié est de environ 1,4 kpb.

Le fragment amplifié a été cloné par ligation dans un vecteur de cl⁺ nage de produits PCR construit de la façon suivante. L'ADN du plasmide pBSIISK- est digéré par l'enzyme de

restricti n EcoRV, puis traité par l'enzyme terminal transférase en présence de dideoxythymidine, dans les conditions décrites par le fournisseur (Boehringer). L'ADN du plasmide recombinant résultant de la ligation du produit PCR avec le vecteur préparé selon les conditions ci-dessus a été préparé en quantité puis digéré par les enzymes de restriction 5 MscI et EcoRV qui coupent toutes deux uniquement dans l'insert et éliminent un fragment de 0,7 kpb. Le fragment de haut poids moléculaire obtenu est séparé du fragment de 0,7 kpb par électrophorèse et purifié à partir du gel. Ce grand fragment est mis à liguer avec un fragment à extrémités franches de 1,1 kpb contenant le gène *ura3*. Ce fragment provient de la digestion par les enzymes de restrictions EcoRI et HindIII du plasmide pYE_{Ura3} commercialisé par 10 Clontech sous la référence 6195-1, suivi d'un remplissage des extrémités cohésives par la polymérase de Klenow, puis d'une purification du fragment de 1,1 kpb contenant le gène *ura3* après électrophorèse en gel d'agarose. Un des plasmides obtenus obtenus a été préparé 15 en masse, puis digéré par les enzymes de restrictions EcoRI et BglII. Le fragment de environ 1,8 kpb a été purifié après électrophorèse en gel d'agarose. Ce fragment linéaire contient environ 0,35 kpb du site EcoRI au début du gène *ura3* inséré, 1,1 kpb correspondant à l'insertion du gène *ura3*, environ 0,35 kpb de la fin du gène *ura3* inséré au site BglII. Ce fragment linéaire sera utilisé par la suite pour obtenir la disruption du gène *acc1* dans la levure. Il sera nommé par la suite : le fragment disruptant.

b- disruption de YPH501

20 Le protocole suivi est décrit dans le "CPMB". Un mg du fragment disruptant est électroporé dans les levures YPH501 électrocompétentes avec un BioRad pulser dans une cuvette de 0,2cm d'épaisseur, 200Ohms, 25 pFarads et 1500volts. Les levures sont étalées sur un milieu minimum (Yeast nitrogen base) contenant tous les acides aminés et bases pour lesquels la souche est auxotrophe (leucine, histidine, lysine, adenine, tryptophane) à l'exception de l'uracile. Ce milieu contient 1M sorbitol comme osmoprotectant. Après 3 jours 25 de croissance à 28°C, les colonies sont repiquées sur le même milieu sans sorbitol. Après 2 à 3 jours de croissance à 28°C, quelques colonies sont ensemencées dans 10 ml du même milieu liquide et misent à pousser pour deux à trois jours, à 28°C et à 250 rpm sur une table agitante.

30 L'ADN chromosomique de ces colonies est extraits suivant le protocole décrit dans le "CPMB". Environ 1 mg d'ADN est digéré par les enzymes de restrictions EcoRI et BglII et soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose. L'ADN est ensuite transféré sur une membrane Nytran (Scleicher et Schüll) en suivant les instructions du fournisseur. Cette membrane est hybride à 65°C dans une solution contenant 0,25% lait écrémé; 6xSSC; 0,1% SDS avec le fragment amplifié de 1,4 kpb rendu radioactif par "random-priming". La membrane est 35 rincée à 65°C dans une solution de 0,5xSSC; 0,1% SDS, puis mise en fluorographie à -70°C avec un film RPXOmat et un écran renforçateur QuantaIII. Après environ 4 heures de fluorographie, les clones disruptée dans une copie du gène *acc1* présentent un profil

d'hybridation de 2 bandes. Une bande à 1,4 kpb correspondant à l'hybridation du fragment EcoRI/BglII de la copie sauvage du gène *acc1* et une bande à 1,8 kpb correspondant au fragment EcoRI/BglII ayant été déleté du fragment MscI/EcoRV et ayant intégré à la place le gène *ura3*. La même hybridation réalisée sur de l'ADN extrait de la souche YPH 501 non transformée ne permet d'observer que la bande à 1,4 kpb.

5 Un des clones de levures présentant le profil ci-dessus a été mis en croissance dans le milieu de sporulation dans les conditions décrites dans le "CPMB". La dissection des spores a été réalisée avec un micromanipulateur de Fombrun. Les spores ont été misent à germer sur un milieu complet de levure YPD supplémenté par différents acides gras: acide myristique, 10 acide oléique, acide stéarique et acide palmitique, chacun à 0,01%, dans 1% du détergent Brij58. Dans ces conditions, seules deux spores sont viables pour chaque asque contenant 4 spores. Les deux spores viables étant haploïdes et auxotrophes pour l'uracile. Cette dernière expérience permet de confirmer que la disruption du gène *acc1* est létale à l'état haploïde, répétant ainsi les travaux décrits par: Hasslacher M., Ivessa A.S., Paltauf F. and Kohlwein 15 S.D. (1993) J.Biol.Chem., 268, 10946-10952. Cette souche diploïde YPH 501 présentant une copie disruptée du gène *acc1* a été nommée YPH 501 Dacc1, et sera utilisé par la suite comme souche récipiendaire pour la complémentaion par les différentes activités ACoACase testées.

2) Obtention d'un clone d'ADNc complet de l'ACoACase de rat.

20 Les différentes expériences ont été réalisées à partir de la séquence de l'ACoACase de rat de 7038 pb a été publiée par: Lopez-Cazillas F., Bai D-H., Luo X., Kong I-S., Hermodson M.A. and Kim K-H. (1988) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 85, 5784-5788. Trois couples 25 d'oligonucléotides ont été synthétisés pour permettre l'amplification par PCR de l'ensemble des fragments constituant l'ADNc complet de l'ACoACase de rat à partir d'ADNc simple brin de foie de rat disponible commercialement chez Clontech sous la référence: 7151-1. Les couples d'oligonucléotides ont été choisis de façon à permettre un remontage facilité de l'ADNc complet car présentant des sites de restrictions uniques.

30 La séquence des 3 couples d'oligonucléotides utilisés est la suivante, la position nucléotidique correspondant à la première base 5' par rapport à la séquence publiée est indiquée entre parenthèse à côté de l'extrémité 5':

1: 5'(1)-ACGTCTCGAGATGGATGAACCATCTCGTTG-3' (le site *Xho*I, rajouté sur l'oligonucléotide et absent de la séquence de l'ACoACase de rat, est souligné. La séquence publiée commence au A juste derrière le site *Xho*I souligné)

1': 5'(2721)-GCCAGAGACACTGGTCATG-3'

35 2: 5'(2515)-CAGAGCACAGCTCTCCGAG-3'

2': 5'(4740)-GTCTTGTCACATACGGAG-3'

3: 5'(4518)-GGTCCTCCAGGCAGAACTG-3'

3': 5'(7038)-CTACGTAGAAGGGGAGTCC-3'

Les conditions utilisées pour l'amplification PCR étaient: 5 ml de Quick-clone cDNA de foie de rat de Clontech, 300ng de chacun des oligos des couples sous un volume de 100ml dans les conditions données par le fournisseur de la Taq DNA polymérase: Perkin-Elmer. Les conditions de cycles sur l'appareil Perkin-Elmer 9600 étaient: 5min/95°C-50x(30sec/95°C-

5 30sec/55°C-3min/72°C)-5min/72°C.

Les produits d'amplification ont été clonés dans un vecteur pBSIISK- selon les mêmes modalités que celles décrites ci-dessus pour le clonage du fragment disruptant. Sauf pour l'insert résultant de l'amplification par les oligonucléotides 1/1' qui a préalablement été digéré par XhoI et XbaI puis ligaturé avec le plasmide pBSIISK- digéré par les mêmes enzymes.

10 Trois fragments clonés ont ainsi été obtenus correspondant à:

l'utilisation du couple d'oligonucléotides 1/1'	pRPA-ML-756
l'utilisation du couple d'oligonucléotides 2/2'	pRPA-ML-751
l'utilisation du couple d'oligonucléotides 3/3'	pRPA-ML-757

15 L'obtention d'un ADNc complet codant pour l'ACoACase de rat à partir de ces trois clones a été effectuée de la façon suivante:

1- l'insert Clal/EcoNI du clone pRPA-ML-751 est ligaturé avec l'ADN du clone pRPA-ML-757 digéré par EcoNI/Clal. Le clone résultant, nommé pRPA-ML-758, contient les deux fragments présents dans pRPA-ML-751 et pRPA-ML-757.

20 2- l'insert XbaI du clone pRPA-ML-758 est ligaturé avec l'ADN du clone pRPA-ML-756 digéré par XbaI. Un des clones résultant de l'orientation en sens requis de l'insert de pRPA-ML-758 dans pRPA-ML-756, nommé pRPA-ML-760, contient les trois fragments présents dans pRPA-ML-756, pRPA-ML-751 et pRPA-ML-757 .

25 Ce plasmide final obtenu a été nommé pRPA-ML-760 et contient un insert de 7038 pb correspondant à l'ADNc complet de l'ACoACase de rat. Cet insert est utilisable pour transfert dans d'autres vecteurs après digestion par XhoI (côté 5'-ATG) et NotI ou EagI (côté 3'-stop).

30 3) Obtention de levure haploïdes disruptées dans le gène acc1 et complémentées par le produit de l'expression de l'ADNc de l'ACoACase de rat

a- transfert de l'ADNc complet de l'ACoACase de rat dans un vecteur d'expression levure

35 Le vecteur d'expression dans la levure pYES2 commercialisé par la société Invitrogen sous la référence V825-20 a été utilisé comme vecteur de base. Une partie du gène *ura3* présent dans ce vecteur a été éliminé par coupure par les enzymes de restrictions ApaI et NheI. Le vecteur délesté a été traité par la T4 DNA polymérase afin de rendre franches les extrémités des coupures.

Deux oligonucléotides de séquence, la position nucléotidique correspondant à la première base 5' par rapport à la séquence publiée est indiquée entre parenthèse à côté de l'extrémité 5':

5'(208)-GTGAGCGCTAGGATCCACTGCCAGG-3'

5'(1434)-CGTTTACAATTCCGGATCCGGTATTTCTCC-3'

ont été utilisés pour amplifier le gène *his3* à partir du plasmide pRS413 commercialisé par la société Stratagene sous la référence: 217413. Le fragment a été amplifié par PCR dans les

5 conditions suivantes: Appareil Perkin 9600; 50ng d'ADN du plasmide pRS413; 300ng de chacun des deux oligonucléotides sous un volume final de 100ml dans les conditions préconisées par Perkin-Elmer, fournisseur de la Taq polymerase; 5min/95°C-25x(30sec/95°C-30sec/55°C-1min30sec/72°C)-5min/72°C. Le fragment amplifié a ensuite été traité par la T4 DNA polymérase afin de rendre franches les extrémités. Le fragment *his3* 10 et le vecteur pYES2 déléé d'une partie du gène *ura3* ont été ligaturés. Le plasmide résultant, nommé pYES2/his3, confère aux levures présentant une mutation *his3* un phénotype d'autotrophie pour l'histidine.

Le plasmide pRPA-ML-760 a été digéré par l'enzyme de restriction EagI, puis traité par la polymérase de Klenow afin de rendre franche cette extrémité, et enfin digéré par l'enzyme XhoI. L'insert contenant l'ADNc complet de l'ACoACase de rat présentant le site XhoI à son extrémité 5' et le site EagI rempli à son extrémité 3' a été purifié. Le vecteur pYES2/his3 a été digéré par l'enzyme XbaI puis traité par la polymérase de Klenow afin de rendre franche cette extrémité, et enfin coupé par XhoI. Le vecteur ainsi coupé a été ligaturé avec l'insert d'ACoACase de rat tel que préparé ci-dessus. Un clone obtenu contient l'ADNc 20 complet de l'ACoACase de rat dans le vecteur pYES2/his3 et a été nommé pRPA-ML-761. Ce plasmide a été utilisé par la suite pour toutes les expériences de transformation de levure et l'expression de l'ACoACase de rat dans les levures transformées.

b- transformation des levures YPH501Dacc1 et obtention de levures haploïdes disruptées

25 Le protocole suivi est décrit dans le "CPMB". Environ 100ng du plasmide pRPA-ML-761 sont électroporés dans les levures YPH501Dacc1 électrocompétentes avec un BioRad pulser dans une cuvette de 0,2cm d'épaisseur, 200Ohms, 25 pFarads et 1500 volts. Les levures sont étalées sur un milieu minimum contenant tous les acides aminés et bases pour lesquels la souche est auxotrophe (leucine, lysine, adenine, tryptophane) à l'exception de 30 l'uracile et de l'histidine. Ce milieu contient 1M sorbitol comme osmoprotectant. Après 3 jours de croissance à 28°C, les colonies sont repiquées sur le même milieu sans sorbitol. Après 2 à 3 jours de croissance à 28°C, une colonie est repiquée sur milieu de sporulation. Les 4 spores issues d'un même asque sont microdisséquées avec un micromanipulateur de Fombrun et mise à germer sur un milieu complet YPD contenant 3% de galactose comme 35 source carbonée.

Les 4 spores formées sont alors repiquées sur milieu minimum à 3% de galactose comme source carbonée contenant tous les acides aminés et bases pour lesquels la souche est auxotrophe (leucine, lysine, adenine, tryptophane) à l'exception de l'uracile et de l'histidine et

un milieu identique mais contenant de l'uracile. Deux des 4 spores poussent sur milieu sans histidine et sans uracile. Les deux autres spores nécessitent de l'uracile pour leur croissance. Les 2 spores poussant sur milieu sans uracile et histidine sont repiquées sur un milieu minimum identique mais contenant 2% de glucose comme source carbonée. Dans ces 5 conditions, aucune croissance n'est observée. Par conséquent les levures haploïdes obtenues présentent bien une disruption du gène *acc1* par le gène *ura3* et d'autre part exprime une activité ACoACase, dépendante de la présence de l'inducteur galactose, capable de complémer l'activité endogène supprimée. Cette levure haploïde disruptée dans le gène *acc1* et complémentée par le produit de l'expression de l'ADNc de l'ACoACase de rat a été 10 nommée Yhap/rat. Cette souche de levure valide la faisabilité de l'objet de l'invention et est un des éléments à la base du test de criblage qui fait l'objet de la présente invention.

Exemple 2

Dans ce second exemple, une souche mutante de *Neurospora crassa* déficiente dans 15 l'expression de l'activité ACoACase endogène a été complémentée fonctionnellement par l'expression d'un fragment d'ADN codant pour l'activité ACoACase d'oïdium.

1) Isolement et caractérisation d'un gène d'ACCase d'*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*

a- souche fongique

La souche *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* (désigné ci-après Egh) 23D5 (Hollomon *et al.*, 20 1984 Proceeding of the British Crop Protection Conference - Pests and Disease, 477-482) est maintenue sur orge (variété Halcyon) en microcosme de 20 plantes. Les plants d'orge de 7 jours sont infectés par la souche 23D5 en secouant des feuilles de plantes infectées dans le microcosme. Les spores d'Egh 23D5 sont récupérées par aspiration 10 jours après l'infection.

b- extraction d'ADN d'Egh

25 Cinq cents mg de spores d'Egh sont broyés dans un mortier avec 500 mg de billes de verre (Sigma Chemical Co.). Le broyat est repris dans 4 ml de tampon d'extraction (200mM Tris-HCl pH8; 25 mM EDTA; 250 mM NaCl, 0,5% SDS; 14 mM β -mercaptoproethanol). Le mélange est chauffé à 65°C pendant 1 heure. 1 ml d'acétate de potassium (4M, pH 5,5) est ajouté et le mélange est mis à 4°C pendant 2 heures. Après une centrifugation de 1 heure à 4°C à 12000 x g, le surnageant est récupéré. L'ADN est alors précipité en présence de 2 volumes d'éthanol à -20°C pendant 1 heure. Après une centrifugation de 1 heure à 4°C à 12000 x g, l'ADN est repris dans 2 ml de TE 7,5 (10 mM Tris-base, 1mM EDTA, pH ajusté à 7.5 avec HCl concentré). Une extraction au phénol/chloroforme (1/1) est effectuée et l'ADN est alors précipité de nouveau par 2 volumes d'éthanol en présence de 1/10 de volume d'acétate de sodium (3M, pH 4,8). Le culot d'ADN est lavé avec de l'éthanol à 70%. L'ADN est repris dans 300 μ l de TE 7,5 et purifié sur un gradient de chlorure de sodium. Les fractions contenant l'ADN propre et non dégradé sont alors conservées à -20°C.

c clonage de l'ADN d'Egh dans le phage lambda EMBL3

L'ADN d'Egh est digéré de façon partielle par l'enzyme de restriction *Sau3AI*. L'ADN partiellement digéré dont la taille est comprise entre 9 et 23 kb est sélectionné par passage sur un gradient de chlorure de sodium. L'ADN obtenu est cloné entre les sites *BamHI* du phage lambda EMBL3 (Stratagene). L'ADN phagique est alors empaqueté *in vitro* en utilisant le kit 5 "Gigapack II Gold Packaging Extract" (Stratagene) en utilisant les conditions recommandées par le fabricant et est ensuite utilisé pour infecter *E. coli* P2392. Le titre de la banque de gènes obtenue est de 10^5 pfu/ml. Après amplification, le titre de la banque de gènes a été porté à 5.10^8 pfu/ml.

d- préparation de la sonde de la région transcarboxylase de l'ACCase de levure.

10 Deux amores oligonucléotidiques #109 ($5'$ GACGAATTCTCAATAAGG $3'$) correspondant aux nucléotides 4800-4819 de la séquence de *Saccharomyces cerevisiae* (Al-Feel *et al.*, 1992, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 89:4534-4538) et #110 ($5'$ GATAATTGAGATCTCAATT $3'$) correspondant aux nucléotides 6168-6188 ont été synthétisées. Ces amores ont été utilisées pour amplifier l'ADN de *S. cerevisiae* DH4 15 (Mullis and Falloona, 1987, Methods Enzymol., 155:335-350). La réaction d'amplification est effectuée dans un volume réactionnel contenant 100 ng d'ADN, 10 mM Tris-HCl pH9, 50mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 % Triton X100, 0,2 mg/ml BSA, 0,1 μ M des amores oligonucléotidiques #109 et 110, 200 μ M de chacun des quatre désoxynucléotides dATP, dCTP, dTTP, dGTP. Différents cycles sont effectués sur un thermocycleur (Autogene II - 20 Grant Instruments (Cambridge) Ltd). Après une étape de dénaturation à 95°C pendant 3 min, 35 cycles de dénaturation à 95°C pendant 1 min, d'hybridation à 50°C pendant 1 min et de synthèse à 72°C pendant 1 min sont effectués. Le mélange réactionnel est ensuite laissé à 72°C pendant 3 min pour une extension finale. L'ADN amplifié est visualisé sur gel d'agarose (1,2%) après coloration au bromure d'éthidium.

25 e- préparation de la sonde de la région transcarboxylase de l'ACCase d'Egh.

L'ADN d'Egh a été digéré par l'enzyme de restriction *EcoRI* (Appligene - France) et mis à migrer sur un gel d'agarose (0,8% agarose dans tampon TBE (0,45 M Tris-Borate; 0,01 M EDTA)). L'ADN a été transféré sur une membrane de nylon (Amersham) en utilisant le système de transfert LKB 2016 Vacugene (Pharmacia LKB Biotechnology) et en suivant le 30 protocole préconisé par le fabricant.

La membrane a été préhybridée à 42 °C dans une solution de SSC 5X, Denhardt's 5X, 30% formamide, 0,1% SDS (Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning, A laboratory manual, 2nd Edition) pendant 3 heures. La sonde marquée correspondant à la partie transcarboxylase de l'ACCase de *S. cerevisiae* est alors ajoutée à la solution de préhybridation et l'hybridation est effectuée à 42 °C pendant 16 heures. La membrane est lavée à 50°C pendant 30 min dans une soluti n de SCC 2x, 0,1% SDS et deux fois 15 min dans une soluti n SCC 2X. Le signal d'hybridation est révélé sur un autoradiogramme.

L'ADN d'Egh présentant une homologie avec la sonde de la région transcarboxylase de la levure a été cloné dans le plasmide pUC18 (Messing, 1983, Methods Enzymol., 101:20) digéré par l'enzyme de restriction EcoRI. Le plasmide a été utilisé pour transformer *E. coli* DH5a.

5 f- marquage des sondes

Les sondes sont marquées radioactivement au ^{32}P en utilisant le "Random Primed DNA Labelling Kit" et en suivant les recommandations du fabricant (Boehringer Mannheim Biochemica).

g- criblage de la banque de gène - Préparation des membranes.

10 Cinquante ml de milieu TB (5g/l NaCl, 10 g/l Tryptone) contenant 1 ml d'une solution de maltose 10% et 0,5 ml d'une solution de 1M MgSO₄ sont inoculés avec *E. coli* P2392. Après une incubation à 37°C sous agitation, les cellules sont centrifugées et reprises dans 10 mM MgSO₄ afin d'avoir une densité optique à 600 nm de 0,5. 50 μl de la banque génomique diluée dans du tampon SM (5,8g/l NaCl, 3,6 g/l MgSO₄.7H₂O, 50 mM Tris-HCl 15 pH 7,5, 0,01% (p/v) gélatine) afin d'avoir 15 plages de lyse par cm² sont ajoutés à 200 μl de cellules bactériennes. Les phages sont absorbés sur les cellules pendant 20 min à 37°C. Ce mélange est alors ajouté à 3 ml de "Top Agar" (Milieu NZ - Gibco BRL 16 g/l, 7 g/l agar) et est étalé sur milieu gélosé (16 g/l milieu NZ - Gibco BRL, 10 g/l agar) en boîte de Petri (diamètre 9 cm). Les boîtes sont alors laissées à 37°C pendant environ 6 heures jusqu'à 20 apparition des plages de lyse. L'ADN phagique est alors transféré sur membrane de nylon (Amersham) en suivant le protocole préconisé par le fabricant.

h- criblage de la banque de gènes

25 Les membranes sont préhybridées à 42 °C dans une solution de SSC 5X, Denhardt's 5X, 30% formamide, 0,1% SDS (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A laboratory manual, 2nd Edition) pendant 3 heures. La sonde marquée est alors ajoutée à la solution de préhybridation et l'hybridation est effectuée à 42 °C pendant 16 heures. Les membranes sont lavées à 50°C pendant 30 min dans une solution de SCC 2X, 0,1% SDS et pendant deux fois 15 min dans une solution SCC 2X. Les signaux d'hybridation sont révélés sur un autoradiogramme.

30 Les plages de lyse donnant un signal d'hybridation sont isolées et le phage est elué dans 1 ml de tampon SM à 4°C. Le phage peut être utilisé pour infecter des cellules bactériennes.

i- extraction de l'ADN phagique

35 Les phages sont récupérés à partir de plage de lyse par elution avec 5 ml de tampon SM par boîte de Petri pendant 2 heures sous agitation à température ambiante. Le milieu SM est ensuite centrifugé à 8000g pendant 10 min à 4°C pour supprimer les débris cellulaires. RNase A et DNase I sont alors ajoutées à une concentration de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ au surnageant et le mélange est incubé pendant 30 min à 37 °C. Puis un volume d'une solution contenant 20%

(p/v) de polyéthylène glycol et 2M de NaCl dans le tampon SM est ajouté et le mélange est incubé 1 heure à 0°C. Les particules phagiques sont alors récupérées par centrifugation à 10000g pendant 20 min à 4°C. Les particules phagiques sont alors reprises dans 0.5 ml de SM. Après centrifugation à 8000g pendant 10 min à 4°C, 5 μ l de SDS 10% et 5 μ l de 0,5 M EDTA pH8 sont ajoutés au surnageant. Le mélange est incubé à 68°C pendant 15min. Deux extractions au phénol/chloroforme (1/1) et une extraction au chloroforme sont alors effectuées. L'ADN est alors précipité par un volume d'isopropanol. Le culot d'ADN est lavé à l'éthanol 70% et repris dans 50 μ l de TE8 et conservé à -20°C.

5 j- séquençage de l'ADN.

10 L'ADN a été séquencé par la méthode enzymatique de Sanger *et al.* (1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 47:5463-5467). Le séquençage du gène de l'ACCase a été effectué dans le laboratoire du Dr. L. Hall à l'Université de Bristol (Bristol - Angleterre) en utilisant un séquenceur automatique (Du Pont Genesis™ 2000 DNA analysis system). Le séquençage a été effectué sur les deux brins.

15 k- Résultat du clonage du gène ACCase d'Egh

Le clonage de l'ADN d'Egh digéré par EcoRI présentant une homologie par hybridation avec la partie transcarboxylase de l'ACCase de levure a permis d'isoler un clone contenant un fragment d'ADN de 3,16 kb. Ce clone pMC1 a été séquencé et a montré une forte homologie (64%) avec l'ACCase de levure. Ce fragment a été utilisé pour cribler la 20 banque d'ADN génomique d'Egh.

Un premier criblage de la banque a permis d'isoler le clone p19.1. p19.1 a été digéré par l'enzyme de restriction SalI (ce qui permet de séparer l'insert de l'ADN phagique) et a été sous cloné dans le plasmide pUC9 digéré par SalI. Un clone p19.1-6 contenant un insert d'environ 8 kb et présentant l'homologie avec pMC1 a été isolé. Le séquençage des 25 extrémités de l'insert contenu dans p19.1-6 a montré que ce clone ne contenait pas le gène d'ACCase d'Egh en entier. L'extrémité 5' de l'insert p19.1-6 correspondant au fragment SalI-XbaI (0,7 kb) a donc été utilisée comme sonde pour cribler une deuxième fois la banque d'ADN génomique d'Egh. Un clone différent de p19.1, p18.1, a été isolé et le sous-clonage dans pUC9 après digestion par SalI a permis d'isoler le clone p18.1-6 présentant l'homologie 30 avec la sonde correspondant à l'extrémité 5' de p19.1-6. L'insert contenu dans p18.1-6 est de 13,5 kb. L'analyse des sites de restriction et le séquençage des extrémités 3' et 5' de ce clone a montré que p18.1-6 avait la même extrémité 3' que le clone p19.1-6 mais possédait environ 5 kb de plus en son extrémité 5'. Le clone p18.1-6 contient le gène de l'ACCase d'Egh en entier ainsi qu'environ 3,5 kb en amont du gène et 3 kb en aval du gène. La séquence SEQ.ID 1 de 35 8123 pb contient 1070 pb de région promotrice ainsi que 80 pb de région 3' du gène de l'ACCase d'*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*.

Le gène de l'ACCase d'Egh est de 6973 bp. Trois introns putatifs ont été localisés dans la séquence. Ces trois introns sont respectivement de 54, 50, et 47 nucléotides. La

séquence d'acides aminés déduites de la séquence d'acides nucléiques (2274 aa) présente 63% d'identité (77% de similarité) avec la séquence de la levure, 47% d'identité (67% de similarité) avec les séquences de rat (Lopez-Casillas *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5784-5788) et de poulet (Takai *et al.*, 1988, J. Biol. Chem. 263: 2651-2657).

5 **2) Obtention de mutants ACCase de *Neurospora crassa*.**

a- souches de *Neurospora crassa*

Deux souches de "mating type" opposé portant la mutation am132 (délétion du gène de la NADP-specific glutamate dehydrogenase (Kinnaird *et al.*, 1982, Gene, 20:387-396)) ont été utilisées. Am132A et Am132a sont cultivées sur milieu Vogel 1X, Sucrose 2%, acide 10 glutamique 0,1%, agar 15g/l à 30°C.

b- construction du vecteur.

La région transcarboxylase du gène de l'ACCase de *N. crassa* a été amplifiée par les amores dégénérées #14997 (5' GTT(C)CGT(C)CTG(T,C)GGT(C)CAA(G)A(C)G^{3'}) et #94 (5' TCGTTG(A)ATG(A)GCC(T)TGG(A)GCG(A,T)GTC(G,T)TTA(G,C)AA^{3'}) déduites de 15 la séquence de *S. cerevisiae* en tenant compte de l'usage des codons chez *N. crassa*. L'amplification avec les amores oligonucléotidiques 14997 et 94 a permis d'obtenir un fragment de 591bp qui a été cloné dans le site *Sma*I du plasmide pUC18. Après séquençage de ce fragment, il a été cloné dans le site *Sma*I du plasmide pEmB119 (Dente *et al.*, 1983, Nucleic Acid Research, 11:1645-1655) portant comme marqueur le gène am cloné dans le 20 site *Bam*HI. Le vecteur obtenu est nommé pNC600.

c- transformation de *N. crassa*

N. crassa Am132A est cultivé sur un milieu incliné (Vogel 1X, sucrose 2%, acide 25 glutamique 6mM, agar 15 g/l) pendant 5 jours. Les spores sont reprises dans un milieu de germination (Vogel 0,5X, sucrose 1,5%, acide glutamique 6mM). La solution de spores est filtrée sur une gaze stérile et la solution de spores est diluée avec du milieu de germination pour obtenir une concentration de spores de 0,5.10⁸ à 10⁹ spores/ml. La solution de spores est mise à incuber à 30°C sous agitation pendant 4 heures. A intervalles réguliers après 3 heures, la germination des spores est vérifiée sous microscope. Lorsque 70-90% des spores 30 ont germé, les spores sont lavées deux fois dans de l'eau stérile, puis une fois dans 10 ml de sorbitol 1M. Les spores sont alors reprises dans 50 ml de sorbitol 1M en présence de 20mg de Novozyme²³⁴ et incubées à 30°C sous agitation pendant 50-70min. La compétence est alors vérifiée en ajoutant 20μl d'eau à 10μl de cellules. Il y a lyse des cellules compétentes. Les cellules sont lavées deux fois dans 10 ml de sorbitol 1M, puis 1 fois dans 10 ml de STC 35 (1M Sorbitol, 50mM Tris-HCl pH8, 50mM CaCl₂). Les cellules compétentes sont alors reprises dans 400μl de STC (par tube utilisé au départ), 5μl de DMSO, et 10μl de PTC (40% polyéthylène glycol 4000, 50mM Tris-HCl pH8, 50mM CaCl₂). Les cellules compétentes sont conservées à -20°C.

Pour la transformation des cellules, 10 μ g de plasmide est mis en présence de 400 μ l de cellules compétentes et de 25 μ l d'héparine (5mg/ml dans STC). Le mélange est mis à incuber 30 min sur la glace. 5 ml de PTC est ajouté et l'incubation est poursuivie pendant 20 min à température ambiante. Différents volumes de cellules transformées sont mélangés à 15 ml de

5 Top Agar (Vogel 1X, 1M Sorbitol, 55mM Sorbose, 1,5mM Glucose, 1,5mM Fructose, 20mM Glycine, 28g/l agar) et étalés sur un milieu gélosé (Vogel 1X, 55mM Sorbose, 1,5mM Glucose, 1,5mM Fructose, 20mM Glycine, 15g/l agar). Après 2 à 3 jours de croissance à 30°C, les transformants sont transférés sur milieu sélectif incliné (Vogel 1X, 2% Sucrose, 20mM glycine, 15g/l agar). Les transformants sont ensuite purifiés par trois passages sur

10 milieu sélectif contenant 1M de sorbitol qui permet l'isolement d'une colonie.

d- croisement de *N. crassa*.

Une des souches parentes est mise à pousser en boîte de Petri sur un milieu minimum de croisement (1g/l KH₂PO₄, 1g/l KNO₃, 0,5g/l MgSO₄.7H₂O, 0,1g/l NaCl, 0,1g/l CaCl₂, 5 μ g/l D-biotine, 1g/l acide glutamique, 15g/l agar et 0,1 ml/l d'une solution contenant 50g/l

15 d'acide citrique, 50 g/l ZnSO₄.7H₂O, 10g/l Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O, 2,5g/l CuSO₄.5H₂O, 0,5g/l MnSO₄.H₂O, 0,5g/l H₃BO₃, 0,5g/l Na₂MoO₄.2H₂O, pH6,5. La source de carbone est la cellulose apportée sous forme de papier Whatman 3MM. La souche est incubée sur ce milieu pendant 6 jours à 25°C avant de la croiser avec une solution de spores de l'autre souche parente. Les spores sont éjectées des périthèces environ 9 jours après le croisement.

20 Les spores sont alors récupérées sur le couvercle de la boîte de Petri et étalées sur le milieu de sélection et incubées à 25°C pendant la nuit. Les spores présentant de longs tubes germinatifs (am+) sont isolées sous microscope.

e- Résultat de la mutation du gène de l'ACCase de *N. crassa*

Chez *N. crassa*, la présence de séquences répétées soumet ces séquences à des mutations pré-méiotiques (Repeat Induced Mutations, Selker, 1990, Annu. Rev. Genet. 24: 579-613). Les séquences répétées sont inactivées par des changements de paires de base (G-C : A-T) et par des méthylations de cytosines. Ce phénomène a été utilisé pour muter le gène codant pour l'ACCase de *N. crassa*.

Pour muter le gène de l'ACCase de *N. crassa*, un vecteur comprenant une partie de la 30 région transcarboxylase du gène de l'ACCase de *N. crassa* ainsi que le gène de la NADP specific glutamate dehydrogenase (gene am) comme marqueur de sélection a été construit et a été utilisé dans la transformation de la souche Am132A (délétée du gène am). 72 transformants ont été récupérés. 24 de ces transformants présentant une croissance rapide ont été purifiés par 3 isolements successifs sur milieu contenant du sorbitol. 12 de ces 24 transformants ont été utilisés dans un croisement avec la souche Am132a. Ce premier croisement a permis de vérifier la stabilité des transformants et de sélectionner la descendance ne portant qu'une seule copie du plasmide. 7 descendants ont été sélectionnés et ont été croisés avec Am132a ou Am132A en fonction de leur mating type. Les descendants

de ce deuxième croisement ont été sélectionnés pour leur différence de croissance sur milieu avec ou sans palmitate. Un mutant MC2C662 a montré une nette différence de croissance en milieu avec ou sans palmitate à 25°C.

3) Complémentation fonctionnelle du mutant ACCase de *N.crassa* par l'ACCase d'Egh

5 Ce mutant MC2C662 est utilisé pour l'expression du gène ACCase d'Egh. Pour cela, l'insert contenu dans le clone p18.1-6 a été séparé du plasmide pUC9 par digestion avec l'enzyme de restriction *Sall* et purification par électrophorèse sur gel d'agarose. Ce fragment *Sall* de 13 kpb contient la partie codante du gène de l'ACCase d'*E.graminis* ainsi que 3,5 kpb de la région 5' amont et 3 kpb de la région 3' aval. Les extrémités de l'insert ont été rendues
10 franches par traitement avec l'ADN polymérase de Klenow. L'insert à bouts francs a ensuite été cloné dans le site *Bgl*II rendu franc par traitement par l'ADN polymérase de Klenow du plasmide pAN7-1 porteur du gène codant pour l'hygromycine B (Punt *et al.*, 1987, Gene, 56:117-124). Un des plasmides obtenu a été nommé pEGH94 et a été utilisé pour la transformation de la souche mutante de *N.crassa* MC2C662 décrite ci-dessus. Une des
15 souches transformée sélectionnée de *N.crassa* est capable de pousser sur un milieu contenant de l'hygromycine et ne contenant pas de palmitate.

Cette souche de *N.crassa* complémentée par l'ACCase d'oïdium valide la faisabilité de l'objet de l'invention et est un des éléments à la base du test de criblage qui fait l'objet de la présente invention.

20

Ces deux exemples montrent bien l'utilisation de la présente invention telle qu'elle a été décrite dans sa généralité ci-dessus, à savoir un test de criblage permettant de déterminer une activité potentielle spécifique d'une cible biochimique déterminée.

25

SEQUENCE LISTING

SEQ. ID. NO. 1

1	TAATGGCAGCCATCTAGCCCCATCACTACTCCAGCCCTCCACGTAAACCATGAGGCTTGT	60
61	AATGGCGTGTGCAAGAAGTGGCTACAGAGATTGGAAAGGATGCATATTGAGACAAGGGC	120
121	TTTCAAGCGCTGTAGCATTCTAGCACTGCTCAACTTAAGCTACCTCACAGCCTTATGAGA	180
181	GATTTGGCCGTTTCCCAGCCACATGGTAAGAAGATGATGATGTCATTACATGACT	240
241	GTAAGGAGGGCTGTGGCGAAAGTCACACATTGCAAGACCCCTCATTCTCGTATTGGAC	300
301	CTTGTATTAAATTAAAGCGGGAAATCCGTGTCCTCACCCCTTGTGATTCTGCCTCAAA	360
361	CTAAAGCGGCTTAAACCTGGCAAACAGGGGGTGTACCGAAGTGTATCCATCACGC	420
421	CGGAATGTACTTTCATCAAGGGCTTGCAGTCTTAGAAGTAATTGGTAATTCTGGA	480
481	ACGGATYGCCTCAGCCTTGCTGTGAGCCATTGAATTCATAGCGATTGCTAXGATT	540
541	GAAAATAGTTGTCACTAGCATTAGTAATCTCCCAGGCAGTCATGTCGGCAGGC	600
601	TGTTGGATTGGCGGGTACCGATATACTTGTGACTGTCACCTCAATCATTCAACTAAATT	660
661	ACCAAATTGGCCCGATGCCAGCCAGCGCTGCGCTGTGTTGGATGATTGACCAAGAGCT	720
721	AGTCAGCTCATCGCTGCAGGAAAAATTCTATGTTCCATGATATGCCGACAGGCCCCAA	780
781	TCTCTAACGTCCCTCATATCTTGAACGTGTCACCTCAATCATTCAACTAAATT	840
841	TTCGCTTCCCCTTATTCTTCAGCTTCAAGCTTCAATAGCTTTACAATACATTTCAGA	900
901	CATTGTGAAAGGGCATAAATTACTCCGAACACTACACTAGGAGTTACTGTCGAAATTAT	960
961	ATATTCTGTCGTACAATATTAAGAAAGATTAGTCTACACTCTTCTACTGTATTACTG	1020
1021	GCGACATCATCACACCAAGCTCGTACTGCGAGCTASAAAACACACACCATGACTGAGA M T E I	1080
1081	TTAACGGTGAAGTCAGAAGACTAACGCTGTGCTGTGCCACTTGTACGCAATCAGTCATACT N G E V R R L S C A V P L V R N Q S Y S	1140
1141	CAGCAAGGCATCAAATTGCTGAGCATTATCGGAGGTAAACAAATTGAAAATGCCCTCTC A R H Q I A E H F I G G N K L E N A S P	1200
1201	CAAGCGATGTCAAGGAGTTGTTGCAAAACATGATGGCCACACTGTTATCACAAACGTA S D V K E F V A K H D G H T V I T N	1260
1261	ATATCTGATTCCCTCTCGTACCTACAAGACTGATTAGTCTGTTCAATTAGGTTCTGATCG V L I A	1320
1321	CAAATAACGGCATAGCTGTGTCAGGAAATCCGATCGGTAGAAAAGTGGCTTATGAGA N N G I A A V K E I R S V R K W A Y E T	1380
1381	CTTTCGGAGATGAACGTGCCATTCAAGTCAGTTACTGTTATGCCAACGCCAGATCTCAAG F G D E R A I Q F T V M A T P E D L Q A	1440
1441	CCAACGCTGACTATATTGCTATGGCTGATCAATATGTAGAGGTTCCGGTGGCACAATA N A D Y I R M A D Q Y V E V P G G T N N	1500
1501	ATAATAATTGCGAAATGTCGAGCTAACGTTAGATGTGGCTGAGCGTATGGATGTCCATG N N C A N V E L I V D V A E R M D V H A	1560
1561	CTGTCTGGCCGGATGGTGAGTCTCCGCTAACGAAACAATTCCAAACATGCTAACCCC	1620

V W A G W

1621	GGTAAGGGGACATGCTTCAGAAAACCAAAGTTACCCGAATCACTTGCAGCCAGCCCCAA G H A S E N P K L P E S L A A S P K	1680
1681	AAAAATCGCTTCATTGGGCCACCAAGGTTCTGCAATGAGATCACTTGGTATAAAATATC K I V F I G P P G S A M R S L G D K I S	1740
1741	CTCAACAATTGTAGCCAGCACGCCAAGGTGCATGTATACTTGGTCCGGAACAGGAGT S T I V A Q H A K V P C I P W S G T G V	1800
1801	AGATCAAGTTGAGGTGAACGACGAAGGAATCGTAAGTGTGATAAGGAAGTATATGAA D Q V E V N D E G I V T V D K E V Y M K	1860
1861	AGGATGTGCAATCCTGGCAGGAGGGACTTGAAAAAGCCGTGAAATTGGTCCCGT G C V Q S W Q E G L E K A R E I G F P V	1920
1921	CATGATCAAAGCTTCCGAAGGTGGCGGTGGCAAGGTATCCGAAAGTAGATTCTGACGA M I K A S E G G G G K G I R K V D S D E	1980
1981	GGGATTGAGGCCCTTACAAAGCTGCTGCAAATGAAATTCTGGATGCCAATATTCTAT G F E A L Y K A A A N E I P G S P I F I	2040
2041	AATGAAGCTTGTGGAAATGCAAGGCATTAGAGGTGCAGTTACTGGCGATGAATATGG M K L A G N A R H L E V Q L L A D E Y G	2100
2101	AAATAATATTCACTATTGGAAAGGGACTGTTCTGTTCAACGAAGACATCAAAATCAT N N I S L F G R D C S V Q R R H Q K I I	2160
2161	TGAGGAGGCCCTGTCACTATTGCAAAGACGTCACATTCAAGATATGGAAAAAGCCGC E E A P V T I A K T S T F Q D M E K A A	2220
2221	CGTACGGCTAGGGCACTTGTAGGCTACGTTCTGCAGGGACTGTCGAATATTGTACTC V R L G R L V G Y V S A G T V E Y L Y S	2280
2281	GCATGCTGAAGATAAAATTCTACTTTGGAAATTAAATCCCCGGCTTCAGGTGAAACATCC H A E D K F Y F L E L N P R L Q V E H P	2340
2341	AACGACAGAAATGGTCAGTGGTGTCAATTACCCGGCACAGCTCAAATGCAATGGG T T E M V S G V N L P A A Q L Q I A M G	2400
2401	ACTTCCCCTTCACAGAACATCGAGACATTGACTATTGTATGGAGTAGATCCCCAGGGATC L P L H R I R D I R L L Y G V D P Q G S	2460
2461	TACAGAGATCGATTITGATTTTCAAGGATTCTCTGAAACTCAGAGGAGGCCAAC T E I D F D F S K D S S S E T Q R R P T	2520
2521	CCCCAAAGGCCACACAACCTGCTGCCAATAACCTCTGAAGACCCCTGGAGAAGGGTTAA P K G H T T A C R I T S E D P G E G F K	2580
2581	GCCATCAAGGGCATGATGCATGAACTAAACTTAAAGTAGCTCTAACGTCTGGGTTA P S S G M M H E L N F R S S S N V W G Y	2640
2641	TTTCTCTGGGTACAGCTGGTGAATTACAGCTTTCAAGACAGTCAGTTGGTCACAT F S V G T A G G I H S F S D S Q F G H I	2700
2701	ATTCGGTACGGTAAAATAGATCAGCATCTGGAAACATATGGTAGTTGCATTAAAGA F A Y G E N R S A S R K H M V V A L K E	2760
2761	ACTAAGCATCAGAGGAGATTCCGCACACGGTCGAGTATTGATTAACCTCCITGAAAC L S I R G D F R T T V E Y L I K L L E T	2820
2821	TCCCGCTTGAAGATAACCCATAACAACGGCTGGCTAGACGAACATTATCTCAAATAA P A F E D N T I T T G W L D E L I S N K	2880

2881	GCTGACTGCTGAAAGACCCGACCCCTACACTAGCTGTTGTTGGTGCAGTTACTAAGGC L T A E R P D P T L A V V C G A V T K A	2940
2941	CCACATTGCGAGTGAGGCTTGCATATCTGAATAACCGAACAGCTAGAAAAGGGACAGGT H I A S E A C I S E Y R T S L E K G Q V	3000
3001	TCCAGCGAAAGATATTCTTAAGACAGTATTTCTATAGATTTCATCTATGATGGGCAGCG P A K D I L K T V F P I D F I Y D G Q R	3060
3061	ATACAAATTACAGCAACCGGTGAGCTTAGACAGTTATCATTTGTTCATCAATGGTTC Y K F T A T R S S L D S Y H L F I N G S	3120
3121	CAAATGCTCTGTTGGTTCAGCCTTAAGCGACGGAGGACTCTGGTTCTCCTCAGTGG K C S V G V R A L S D G G L L V L L S G	3180
3181	TCGGAGTCACAATGCTACTGGAAAGAAGAAGTTGGAGCTACAGATTGAGCGTCGATAG R S H N V Y W K E E V G A T R L S V D S	3240
3241	TAAAACATGCTTATTAGAGCAAGAGAATGACCCCTCTCAGCTTAGAACCCCATCACCTGG K T C L L E Q E N D P S Q L R T P S P G	3300
3301	AAAATTAGTCAAGTACACTGTTGAAAACGGAGAGCACGTCAAGACGGGGCAACCATTGC K L V K Y T V E N G E H V K T G Q P F A	3360
3361	TGAAGTAGAGGTGATGAAGATGTAATGCCGCTACTCGCAGCTGAGGACGGTATTGTACA E V E V M K M Y M P L L A A E D G I V Q	3420
3421	ACTTATAAAAACAACCTGGGGCAACTCTTGAAGCAGGAGATATTGGAAATACTTGTCT L I K Q P G A T L E A G D I L G I L A L	3480
3481	AGACGACCCCTCGAGAGTAAAACAAGCGCACCTTCTAGGACAACACTACCTGACTTGGG D D P S R V K Q A Q P F L G Q L P D L G	3540
3541	ACCTCCTCAGGTGTTGGAACGAAGCCGGCTCAAAGATTGCTTACTGCACAATGTGCT P P Q V V G T K P A Q R F V L L H N V L	3600
3601	ACTCAACATTTAGACGGTTTCGACAATCAAGTTATCATGGCAGCTTCTTGAGAGAACT L N I L D G F D N Q V I M A A S L R E L	3660
3661	TATCGATGTCCTCCGGATCCAGAGCTCCCTACGGCAATGGAACGCCAGTTCCGC I D V L R D P E L P Y G E W N A Q F S A	3720
3721	TCTCAGCTCGAGAACGCCCCCTCGCCACTGCAAGCTTGTCAAGTAATGGACCGTTC L S S R M P P R L A T T F A Q V M D R S	3780
3781	AAGACAAAGAAAAGCGATTTCCAGCAGAAATCTGTCAAAAGCTCTGAATAAATTCT R Q R K A D F P A R N L S K A L N K F L	3840
3841	TGACGAAAGCGTTGATCCAGCTGATATAGACGGCCTCAAAGCCACGTTATCCCCCTGAA D E S V D P A D I D A L K A T L S P L N	3900
3901	TGACGTAATGGAGAGATACGCTGAAAGTCAGAAAGCTCATGAATTAACTGATTGCTGA D V M E R Y A E S Q K A H E F N V F A D	3960
3961	CCTCCTAGAGCGGTATGCAGGAGTAGAAAGATTGTTCCAATCGAACATCTCGTACGGA L L E R Y A A V E R L F S N R T S R D E	4020
4021	GGAAGTTATACTAAAACTAAGAGATGAAATAAGGACGATATTCAAAGTAATTCAAGAC E V I L K L R D E N K D D I S K V I Q T	4080
4081	CGTTCTTCTCATAGTAGAATCGGAGCTAAGAATACTGATTCTAGCCATACTAGATGA V L S H S R I G A K N N L I L A I L D E	4140

4141	GTATAAACCAACAAGCCTCATGCCGGTAATGTTGACAGTCTTTAGGCCGGCTCTCG Y K P N K P H A G N V A Q F F R P A L R	4200
4201	AAAGTTGACTGAACCTGAAATCACGACAAACAGCAAAAGTTCCCTCAAAGCCCGTGA K L T E L E S R Q T A K V S L K A R E L	4260
4261	GCTCATTCAATGTGCTATGCCCTCATTAGAAGAGCGAGCAGCTCAGATGGAACATATCCT L I Q C A M P S L E E R A A Q M E H I L	4320
4321	ACGATCATCAGTTGTTGAGTCAGGTACGGTAAACAGGATGGGAACACCGCGAACCTGA R S S V V E S R Y G E T G W E H R E P D	4380
4381	CATTGAAGTGCTCAAAGAAGTCGTCGATTCTAAATATAACGGTCTTGTATGCTACCGCT I E V L K E V V D S K Y T V F D V L P L	4440
4441	TTTCTTCGGCCATCAAGATCCATGGGTCTCGCTTGCTCTGAAGTTACATCAGCG F F G H Q D P W V S L A A L E V Y I R R	4500
4501	TGCATATCGTGCCTACTCTTTAAAAAGGTTGAGTACCAACACGATAGTTCTGATTCCCC A Y R A Y S L K K V E Y H N D S S D S P	4560
4561	TTTCATTGTCTTGGGACTTTGACTTCGAAACGTTGGCACGTCTGAATTGGACTACC F I V S W D F V L R N V G T S E F G L P	4620
4621	AGCCCAGTCAGGCGCAGTTACACCTGCCCTTCAGATTCAAAGTAATTTCACCGCT A Q S G A V T P A S S D F K S N F Q R V	4680
4681	CGCCTCCATCAGCGACATGTCAATCTTGTGAATCGCGAGAGCCACGAACCTATTAGAA A S I S D M S Y L V N R E S H E P I R K	4740
4741	GGGGGTCAAGTACCCGTCCTTATCTCGATGAAGCCGAAGAATACCTGGTCCGAGCCCT G V I V P V P Y L D E A E E Y L V R A L	4800
4801	CGAGTTCTCCTACATCTTCAGGTAGGAAGAAGTACCCCTAACGGACTGATGCCAGATCT E F L P T S S G R K K Y P N G L M P D L	4860
4861	GGCAGGGAAACCGGAAGACGGTGTCTTCTTAATGCTGAAGACGAATTAAACAGCTGTAGT A G K R K T V S S S N A E D E L T A V V	4920
4921	GAATGTTGCACTCGTGAACCCGAAAGCCATGATGATAATGAAACAGTTGCTAGGATCAA N V A V R D S E S H D D N E T V A R I N	4980
4981	TGCAATCGTAAAGAGATCAAATCAGAACTATTGTCTCGCCCGTCCGTCGCTAACGTT A I V K E I K S E L L S R R V R R L T F	5040
5041	CATCTGTGGTCACAAAGATGGATCTTACCCAGGATACTACACTTCCGTGGCCCCAAATA I C G H K D G S Y P G Y Y T F R G P K Y	5100
5101	CGAAGAGGACAAAGTATTGTCACAGTGAACCGCTCTAGCCCTTCAACTGAACTCGA E E D Q S I R H S E P A L A F Q L E L E	5160
5161	AAGGTTGTCACAAATTCAAGGATCCGGCTGTATTACCGAAAATCGGAATATTCAATCTA R L S K F R I R P V F T E N R N I H I Y	5220
5221	CGAGGCAATCGGAACATGTTGAGGGCGACAAACGGTATTTCACACGTCAGTTGTCG E A I G N N V E G D K R Y F T R A V V R	5280
5281	CCCAGGAAGACTAAAGAGATGAAATTCCAACGTGGCAGTACCTTATCTCTGAGTCTGATAG P G R L R D E I P T A E Y L I S E S D R	5340
5341	ACTGATGAATGATATTCTCGATGCCCTGGAGATAATTGGAATAACAAATTCTGACCTAAA L M N D I L D A L E I I G N N N S D L N	5400
5401	TCACATCTCATAAAACTTTCGCCGTCTTCCCTGAGCCACCAAGTAGAGGAAGC	5460

H I F I N F S P V F P L Q P P E V E E A	
5461 TCTCGGTGGATTTAGAGCGTTTGGACGACGTCTTGGAGATTGGCTGTACTGGCGC L G G F L E R F G R R L W R L R V T G A	5520
5521 TGAGATAACGCATCATTGTACTGATCTATCACTAGCATGCCCTATCCTCTCCGTGTTGT E I R I I C T D P I T S M P Y P L R V V	5580
5581 CATCACAAACACCTCTGGATACGTCAAGTGGAGATGTACGCCGAAAGAAAATCCGA I T N T S G Y V I Q V E M Y A E R K S E	5640
5641 AAAGGGTGGCGAATGGGTCTTCCACAGTATCGGAGGTACGACTCCTATCGGATCCATGCA K G G E W V F H S I G G T T P I G S M H	5700
5701 CTTGAGATCTGTTCAACTCCATATCCCACCAAGGAGTGGCTCAACCTAAAAGGTATAA L R S V S T P Y P T K E W L Q P K R Y K	5760
5761 GGGCCACTTGATGGGCACGCAGTATGTCTATGACTTCCCAGAATTGGTAGACAATCCAT A H L M G T Q Y V Y D F P E L F R Q S I	5820
5821 TCAAAATAGTTGGTCAAAGCTGCTCGCAAGCATCCTTCACTACTCGAAAAGCAGCCAGC Q N S W S K A A R K H P S L L E K Q P A	5880
5881 CACCGGGGAGTGCATTGACTTCAGTGAGCTTGGACACCGACACCGACAATCTGCTGA T G E C I D F S E L V L D D T D N L A E	5940
5941 AGTTAACGTGAGCCAGGAACTAACAGTCACGGAATGGTGGATGGATTATTACAGCAAG V N R E P G T N S H G M V G W I I T A R	6000
6001 AACCCCCAGAGTATCCCAGAGGTCGAAAGTTGTCGTGGTCGCAAATGACATCACATTAA T P E Y P R G R K F V V V V A N D I T F K	6060
6061 AATTGGCAGTTTGGCCGAAAGAAGACCAATTTCACAAATGTACCGAACITGCAAG I G S F G P K E D Q F F H K C T E L A R	6120
6121 GAAATTGGGCATAACCGGGCTCTTTATCTGCTAATTCTGGAGCTCGAATTGGTATGGC K L G I P R V Y L S A N S G A R I G M A	6180
6181 AGAAGAGCTGATACCTCATTTCAATGTCGCTTGGAACGACCCAGAAAACCGGAGGCTGG E E L I P H F N V A W N D P E K P E A G	6240
6241 TTTCAAGTATCTATACTCAATCGAGATGCCAAAAACGCTTCGAAGACGGAAAGACAAA F K Y L Y L N R D A K K R F E D G K T K	6300
6301 AGAGGTTATCACAGAAGAGATTGGAGGGAGAAAATCGTACCGTATAACCACAAT E V I T E E I V E D G E T R Y R I T T I	6360
6361 AGTTGGTGTGAAGACGGCTTGGTGTGAAATGTCTAAAGGGCTCAGGTTAATTGCAAG V G A E D G L G V E C L K G S G L I A G	6420
6421 GGCTACAACTCGTCATATGAGGACATCTCACATTACCCCTGTGACATGTAGGTCGGT A T S R A Y E D I F T I T L V T C R S V	6480
6481 TGGAAATCGGGCTTATCTGTTGGCTTGGACAAACGACCTATCCAATAGAAGGGCAGCC G I G A Y L V R L G Q R A I Q I E G Q P	6540
6541 TATTATTCTTACTGGTGGCCCTGCAATTAAACAAACTCTTGGCCCGAAGTATATACTTC I I L T G A P A I N K L L G R E V Y T S	6600
6601 AAACCTGCAACTGGTGGAACCCAAATTATGTATCGCAATGGAGTCTCTCACATGACGGC N L Q L G G T Q I M Y R N G V S H M T A	6660
6661 AACTGATGATTTGGGGTGTTCAAAATTCTCGAGTGGATGTCTACGTACCCGACAA T D D F E G V S K I L E W M S Y V P D K	6720

6721	AAGGAACAATCCATTACCAATTGGACCGGCAAGTGATTGGTGGATCGGGAAAGTGAGTTA R N N P L P I G P A S D S W D R E V S Y	6780
6781	CTCACCAACCTAAGCAGCCATATGATGTTAGATGGCTATCGCTGGCAAGGACGACGA S P P P K Q P Y D V R W L I A G K D D E	6840
6841	AGAAGGGTTTTACCTGGTCTATTGATAAGGACTCTTCGTCGAAACTCTGGTGGCTG E G F L P G L F D K D S F V E T L G G W	6900
6901	GGCCAAGACTGTTGTTGCGGTGCAAGACTTGGTGGTATTCCAATGGGTGTAATTGG A K T V V V G R A R L G G I P M G V I G	6960
6961	TGTTGAAACCCGTTCACTCGAAAATATTACACCCGCAGACCCCTGCAAACCCCTGATTCTAC V E T R S V E N I T P A D P A N P D S T	7020
7021	AGAGCAAATTACCAATGAAGCAGGCGGAGTATGGTATCCAAACTCTGCTTTAAGACTGC E Q I T N E A G G V W Y P N S A F K T A	7080
7081	TCAAGCAATCAAGGACTTCAATAATGGCGAACAGTGTGCGTTGATGATACTTGCTAATTG Q A I K D F N N G E Q L P L M I L A N W	7140
7141	GAGAGGTTCTCTGGAGGTCAAGCAGGCGGATATGTACAATGAGGTATTGAAATATGGCTCATA R G F S G G Q R D M Y N E V L K Y G S Y	7200
7201	CATTGTCGATGCCCTGGTCAAGTACGAGCAACCAATTGGTATATATACCTCCATTGG I V D A L V K Y E Q P I F V Y I P P F G	7260
7261	AGAGCTACGCCGAGGCTCTGGGTAAGTTATCAACACTGGACTACTAAAATTATTCTAA E L R G G S W	7320
7321	CGATTGCAGGTTGTCGTTGACCTACCATTAATCCGATTATGGAGATGTATGCTGAT V V V D P T I N P D F M E M Y A D	7380
7381	ATCGACTCTCGCGGTGGCGTCTTGAGCCTGAAGGTATAGTAAACATCAAACCGTCGT I D S R G G V L E P E G I V N I K Y R R	7440
7441	GATAAGCAACTCGAGACTATGGCACGTCTGGACCCCTGAGTACGGTGTCTTCGAAGCAG D K Q L E T M A R L D P E Y G A L R K Q	7500
7501	CTCACAGATCCGTCACTCACTCCAGATCAATTAAAGTGTATTAAAGTCAAAGCAAGTGC L T D P S L T P D Q L S D I K V K A S A	7560
7561	CGTGAACAATTACTTTACCTGTACATGCAGGTTCAATTACAGTTGCCGATTACAC R E Q L L L P V Y M Q V S L Q F A D L H	7620
7621	GATCGAGCTGGCGTATGAAAGCAAAAGATGTAATACGTCACTGATTAGTCTGGAGAGAA D R A G R M K A K D V I R Q S L V W R E	7680
7681	GCTCGCCGCTTCTTCACTGGCGGTACGTGCGTGTAAAGAAGAGTATATTCTAAAG A R R F F Y W R V R R R V N E E Y I L K	7740
7741	CGTATGTCACGGCGTCAAGAATTCTGAAATCCCGAGCTCGAAACATTGCAACTTTA R M S T A S K N S L K S R A R N I A T L	7800
7801	TCTGCATGGACTGGCATTTCAATTGTCGAAACGGCTGACCGTGAGGTGCGCAATGTGGTAC S A W T G I S L F E T A D R E V A M W Y	7860
7861	GAAGAAAATCGTAAAGTTGCGGTGAGAAGGTGAGTCTCTCAAACATGATGACGTAGCA E E N R K V V G E K V E S L K T D D V A	7920
7921	TTCGAGGTTCTAGCCTTGCTGCGATCTAATGAAAGGGTGGACTTAAAGGTGTACACCAG F E V S A L L R S N G K G G L K G V H Q	7980

7981 GTGCTGAGTATGTTCCCTGCAAATGAGAGGGAGAGGGCGTTAAGATACTTGAGTGAGACG 8040
V L S M L P A N E R E E A L R Y L S E T
8041 TAAACAGATTGAAATATTTGAAAGTCCTACTTTTCCCTAGTCACITCATAGGGACGAG 8100
*
8101 AGGATAATATTTGTATATATATA 8123

Revendications

5

1. Microorganisme, caractérisé en ce qu'il ne présente plus, par mutation, d'activité homologue de l'activité d'une cible biochimique déterminée et qu'il est complémenté par expression de l'activité cible ou d'une activité homologue.

10

2. Microorganisme selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il est de type eukaryote.

3. Microorganisme selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est constitué par une levure.

15

4. Microorganisme selon la revendication 3, caractérisé en ce que la levure est du type *Saccharomyces*.

20

5. Microorganisme selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est constitué par un champignon.

6. Microorganisme selon la revendication 5, caractérisé en ce que le champignon est du type *Neurospora*.

25

7. Microorganisme selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la cible biochimique est l'acétylcoenzymeAcarboxylase: ACoACase, EC 6.4.1.2.

8. Microorganisme selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'ACoACase provient du rat: *Ratus norvegicus*.

30

9. Microorganisme selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'ACoACase provient de *Erysiphe graminis* SEQ ID NO: 1 .

35

10- Système de criblage permettant de sélectionner des molécules ayant une activité spécifiquement dirigée contre une cible biochimique déterminée, comprenant au moins deux microorganismes, selon l'une des revendications 1 à 9, identiques du point de vue génétique à l'exception de l'activité cible ou d'un homologue de cette activité:

- le premier pour tester l'expression de l'activité cible capable de complémenter un microorganisme ne présentant plus d'activité homologue endogène et permettre ainsi sa croissance,
- le second pour tester l'expression d'une activité homologue à l'activité cible provenant d'un organisme quelconque et capable de complémenter le même microorganisme ne présentant plus d'activité homologue endogène et permettre ainsi sa croissance.

5 11- Système de criblage selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend deux microorganismes distincts.

10 12- Système de criblage selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il comprend trois microorganismes distincts.

15 13- Système de criblage selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisé en ce que la cible biochimique est choisie de sorte que l'inhibition de l'activité de la cible biochimique soit létale pour la croissance du microorganisme complémenté, au moins dans un milieu de culture déterminé.

20 14-. Procédé de criblage permettant de sélectionner des molécules ayant une activité spécifiquement dirigée contre une cible biochimique déterminée, caractérisé en ce qu'on applique le produit à tester sur chacun des microorganismes du système selon l'une des revendications 10 à 13 et qu'on effectue l'observation de l'inhibition différentielle, par le produit testé, de la cible et d'un de ses homologues.

25 15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'on sélectionne des molécules ayant une action protectrice des plantes.

16-. Séquence du gène codant pour l'ACoACase d'*Erysiphe graminis* selon SEQ ID NO:1.

REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLERAPPORT DE RECHERCHE
PRELIMINAIREétabli sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

2727129

N° d'enregistrement
nationalFA 506994
FR 9414187

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
D, X	J BIOL CHEM 268 (15). 1993. 10946-10952, HASLACHER, M. ET AL. 'ACETYL - COA CARBOXYLASE FROM YEAST IS AN ESSENTIAL ENZYME AND IS REGULATED BY FACTORS THAT CONTROL PHOSPHOLIPID METABOLISM.' * page 10949, colonne de gauche, ligne 11 - colonne de droite, ligne 16 * ---	1-4, 7
A	EP-A-0 608 722 (AMERICAN CYANAMID CO) 3 Août 1994 * page 2, ligne 18 - ligne 46 * * page 4, ligne 22 - ligne 26 * ---	10-14
X	GLOVER, D. (ed.) 'DNA cloning volume III: a practical approach'; 1987, IRL Press Ltd. Oxford, GB pages 141-161; CARTER, B. et al.: 'Expression and secretion of foreign genes in yeast' * page 144, ligne 5 - page 146, ligne 14 * * figure 2 * * page 148, ligne 4 - page 149 * ---	1-4
X	WO-A-91 13971 (HAWAII BIOTECHNOLOGY GROUP INC) 19 Septembre 1991 * page 2, ligne 18 - ligne 25 * * page 5, ligne 15 - ligne 22 * ---	1, 5, 6
X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 88, no. 5, 1 Mars 1991 pages 1731-1735, XP 000178717 ELLEDGE, S. ET AL. 'lambdaYES: A MULTIFUNCTIONAL cDNA EXPRESSION VECTOR FOR THE ISOLATION OF GENES BY COMPLEMENTATION OF YEAST AND ESCHERICHIA COLI MUTATIONS' * le document en entier * -----	1-4
1		Date d'achèvement de la recherche
22 Août 1995		Examinateur
		Andres, S
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'un moins une revendication en arrière-plan technologique général O : divulgence non-titrée P : document intermédiaire		
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons R : membre de la même famille, document correspondant		

Microorganism with specific biochemical activity deleted by mutation

Patent Number: FR2727129
Publication date: 1996-05-24
Inventor(s): LEBRUN MICHEL;; GROSJEAN COURNOYER MARIE CLAIR;; HOLLOWOM DEREK W
Applicant(s): RHONE POULENC AGROCHIMIE (FR)
Requested Patent: FR2727129
Application Number: FR19940014187 19941121
Priority Number(s): FR19940014187 19941121
IPC Classification: C12N1/16; C12N1/14; C12N15/52; C12Q1/02
EC Classification: C12N9/00L, C12Q1/18
Equivalents:

Abstract

Microorganism (A) mutated so that it does not have activity homologous to a target activity but is complemented by expression of the target (or homologous) activity is new. Also new is a system for screening to detect cpds. with specific activity against a partic. biochemical target comprising at least 2 microorganisms genetically identical except for target or homologous activity. The gene for ACoACase (acetyl coenzyme A carboxylase) of Erysiphe graminis, having the sequence of 8123 bp given in the specification is claimed.

Data supplied from the esp@cenet database - I2